

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 上梶 友記子
Name

学位論文題目： シクロデキストリンを用いたコエンザイムQ₁₀のミセルに関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

第1章 緒言

本研究論文における中心課題は、コエンザイムQ₁₀ (CoQ₁₀) のミセルである。CoQ₁₀のミセルをシクロデキストリン (CD) 包接複合体を中間原料として、グリチルリチン酸塩とCoQ₁₀とのミセル作製する手法を提案し、化粧品への応用を検討し製品化した。近年、食品や化粧品分野では、飲料の透明化や機能性成分を配合した化粧品から機能性成分の吸収性促進を目的として、機能性成分をミセル化した製品開発が盛んに実施されている。特に、粒子径が20~100 nmのものをナノエマルジョン、若しくはミセルと言い、見た目に透明な溶液である。用いられる機能性成分には難溶性物質が多く、特にCoQ₁₀は水への溶解度が非常に低い。CoQ₁₀を配合した機能性飲料や美容液も市販されているが、その水溶液は完全に透明なものから、懸濁状態のものまで様々である。ナノエマルジョンやミセルは安定性や吸収性、テクスチャーの改善等に重要な役割を果たしている。ミセルは界面活性剤分子の集合体であり、液中に分散されている。界面活性剤は、水と空気の界面、水と油の界面等に吸着する。界面活性剤の濃度が高まって水中の界面活性剤がある一定濃度 (臨界ミセル濃度) 以上に増えると、界面活性剤同士が凝集してより安定な形態に変化する。ミセルの形状や大きさは、界面活性剤濃度、温度、pH、イオン強度等に関係している。一般的に、ナノエマルジョンやミセルの作製手法には、凝集法や分散法等の方法がある。凝集法は均一な溶液状態から、環境を変えることによって分散相を分離させる手法である。分散法は分散相の塊に乳化機等で機械的エネルギーを加えることで細かい粒子にする手法である。同一分子内に疎水基と親水基を持つ両新媒性分子 (界面活性剤) は水中でミセルを形成する。ミセルが形成されるのは両新媒性分子間のVan der Waals力、疎水性相互作用、水素結合等に由来するもので、そのような相互作用は共有結合等に比べて弱い力である。ミセルはその中に有機化合物を取り込むことができ、有機化合物を水に可溶化することができる。本研究では、ミセルを形成する界面活性剤として、グリチルリチン酸ジカリウム (GZK₂) およびタウロコール酸ナトリウムを用いて、CoQ₁₀とのミセルを作製し、その特質について検討した。

これまでに、CoQ₁₀を γ -CDによって包接化することで、CoQ₁₀の安定性や吸収性が向上することを確認した。CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体の吸収性に関しては、*in vitro*, *in vivo* の両方で改善作用が認められている。*In vitro* に関して、腸間膜モデルのCaco-2細胞を用いた検討においては、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体を用いた場合に、高い細胞への取込みが確認されている。これは、先に述べた胆汁酸との乳化作用の亢進によるものであると考えられている。*In vivo* に関しては、動物や健康人を対象とした単回経口投与試験において、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体の有用性を確認している。CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体は、不溶性で分散性に優れた数100 nmの微粒子を形成することがこれまでに知られており、こうした特性改善が生物学的利用能の向上に影響しているものと示唆される。

最近では界面活性剤を用いた様々なCoQ₁₀の可溶化(ミセル形成)検討が行われている。報告されているCoQ₁₀のマイクロエマルジョンやミセルの調製方法としては、CoQ₁₀を脂肪酸、トリグリセリド等の油脂に溶解し(油相)、シュガーエステル、ポリグリセロールエステル、ポリエチレングリコール、レシチン等の界面活性剤や乳化剤を含む溶液(水相)と混合する。さらに必要に応じて、多糖類等を安定剤として使用し、高压ホモジナイザーや超臨界法を用いて作製する手法が報告されている。更にCoQ₁₀のナノエマルジョン形成による効果としては、医薬品若しくは食品用途での経口吸収性の向上や化粧品用途での皮膚透過性の向上が報告されている。しかしながら、これらはCoQ₁₀の経口吸収性向上を目的として生理学・薬理的側面から研究されているものが多いため、物理化学的にミセル形成の機序を議論しているものは少ないのが現状である。また、多くの場合がCoQ₁₀の水への溶解性に関して飛躍的な改善効果は認められておらず、水溶液が透明性を示す100 nm以下の粒子径のミセルを形成するには至っていない。また、界面活性剤とCDの相互作用を評価している論文は多数あるが、その系に脂溶性物質の可溶化を組み合わせた手法はほとんど報告例がない。何故ならば、CDが界面活性剤の疎水部分と相互作用する可能性が高く、界面活性能を損なう恐れがあるからである。我々は γ -CDによるCoQ₁₀の高分散化の利点を活かしつつ、界面活性剤とCDとの相互作用を逆手に取り、全く新規な手法でCoQ₁₀のミセル形成、それに伴う水への飛躍的な溶解性の向上を成功させ報告するに至った。具体的には、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体とGZK₂の併用によって、CoQ₁₀の水への溶解性が最大で約2.5 mMまで飛躍的に上昇することが確認された。CoQ₁₀と γ -CDの物理混合物にGZK₂を添加しても、十分な溶解度上昇は認められなかった。このことから、CoQ₁₀が γ -CDの分子空洞内に取り込まれて包接複合体を形成していることが、CoQ₁₀の溶解性改善、つまりミセル形成に重要と考えられる。

本研究では、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体を中間物質としたGZK₂によるCoQ₁₀のミセルは、それ単独を分離することが困難であったため混合物の状態を検討した。可溶化した水溶液中にはCoQ₁₀とGZK₂のミセルの他に、水溶性GZK₂/ γ -CD包接複合体やCoQ₁₀を包括していないブランクのGZK₂ミセルも含まれる。ここでは、これらの混合液を「CoQ₁₀ミセル」と称する。

第1章では、緒言としてミセルとCDについての概略、本研究で中間物質として用いたCoQ₁₀/ γ -CD包接複合体の特性、その構成原料となるCoQ₁₀および γ -CDの概要を示した。第2章では、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体を中間物質として用いたGZK₂によるCoQ₁₀のミセル形成の機構を明らかとするため、GZK₂を添加した際のCoQ₁₀/ γ -CD包接複合体からのCoQ₁₀および γ -CDの溶解挙動や、水溶液中のCoQ₁₀ミセルの物理化学的特性を高速液体クロマトグラフ(HPLC)による定量にて評価した。また、CoQ₁₀ミセルの平均粒子径を動的光散乱(DLS)にて測定し、CoQ₁₀ミセルの構造を原子間力顕微鏡(AFM)にて直接的に観察した。第3章では、CoQ₁₀、GZK₂共に化粧品素材として使用されている有効成分であることから、得られたCoQ₁₀ミセルの機能性を評価する目的で、*in vitro*による皮膚吸収性試験を実施した。試験にはヒト3次元培養表皮モデルを用いて、表皮組織に取り込まれたCoQ₁₀量を求め、CoQ₁₀製剤としてのCoQ₁₀ミセルを評価した。第4章では、胆汁酸の一種であるタウロコール酸ナトリウムを含有する模擬人工腸液を用いて、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体からのCoQ₁₀の溶出挙動を評価した。尚、タウロコール酸ナトリウムもGZK₂同様に γ -CDとの相互作用が強く、界面活性能を有する化合物である。また、CoQ₁₀は酸化型と還元型の2つの構造体があり、エネルギー産生においてはどちらも必要な補酵素であるが、抗酸化活性を発揮するのは還元型CoQ₁₀である。そこで、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体と還元剤としてアスコルビン酸(ビタミンC; VC)を同時に経口摂取した場合を想定し、人工腸液中でのVCによる酸化型CoQ₁₀から還元型CoQ₁₀への変換を検討した。第5章では、結言として本研究の総括を示した。

第2章 CoQ₁₀ミセルの物性評価

動物やヒトへの経口吸収性評価において、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体は水に不溶な包接複合体を形成するにも関わらず、CoQ₁₀の生物学的利用能が未包接のCoQ₁₀原末そのものに比較して大幅な上昇が認め

られている。また、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体の推定構造の分子モデル研究も報告されている。γ-CDとCoQ₁₀との包接複合体に関して、数μmの微粒子を形成することが知られている。更に、そのCoQ₁₀/γ-CD包接複合体の懸濁液にGZK₂を添加することによって、室温でのCoQ₁₀の水への溶解度が2.5 mMに増加することが認められている。GZK₂は疎水性のトリテルペノイド骨格と親水性のジグルクロン酸部位を有し、その構造から界面活性剤として機能する。GZK₂の臨界ミセル濃度はpH 7.4の中性域で1.0 mM、pH4.9の弱酸性域で0.7 mMであり、比較的低い濃度でミセル形成が可能である。GZK₂は陰イオン性の界面活性剤であるのみならず、抗アレルギー薬や抗炎症薬として使用されている。CoQ₁₀の高い溶解性は、GZK₂とγ-CDの高い結合定数と、分子レベルで包括される新規なミセル形成に関連付けられている。GZK₂はγ-CDと1:1の非常に安定な水溶性の包接複合体を形成することが知られている。γ-CD空洞内のCoQ₁₀とGZK₂との置換反応に伴う、GZK₂とγ-CDとの水溶性の包接複合体形成、およびCoQ₁₀とGZK₂とのミセル形成に関する、分子レベルで包括されたミセル形成のメカニズムを提案している。第2章ではCoQ₁₀とGZK₂とのミセルの形成機構を、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体を用いて調査した。γ-CD空洞内のCoQ₁₀からGZK₂への置換反応、およびCoQ₁₀とGZK₂とのミセル形成に対するみかけの速度定数を得た。加えて、ミセル形成に関与していない沈殿物中のγ-CD中のCoQ₁₀の含有率を示差走査熱量測定 (DSC) で評価した。

CoQ₁₀/γ-CD包接複合体を用いたCoQ₁₀とGZK₂のミセル形成のメカニズムをγ-CD空洞内のCoQ₁₀とGZK₂の置換反応、CoQ₁₀とGZK₂のミセル形成反応の逐次反応からなると仮定した。式1はγ-CDに包接されたCoQ₁₀とGZK₂の置換反応、そして式2はγ-CDから放出されたCoQ₁₀とGZK₂のミセル形成反応を示す。



式1において、γ-CD·(CoQ₁₀)_m はCoQ₁₀とγ-CDとの包接複合体を、γ-CD·GZK₂はGZK₂とγ-CDとの包接複合体を示している。式2において、CoQ₁₀·(GZK₂)_n はCoQ₁₀とGZK₂とのミセルを示している。CoQ₁₀/γ-CD包接複合体中のγ-CDに対するCoQ₁₀のモル比 m は0.4とし、CoQ₁₀とGZK₂のミセル中のCoQ₁₀に対するGZK₂の化学量論係数は n とした。GZK₂とγ-CDとの包接複合体形成の平衡定数 (K_1) は式3に、CoQ₁₀とGZK₂とのミセル形成の平衡定数 (K_2) は式4に示す。γ-CD·(CoQ₁₀)_{0.4} は包接複合体の懸濁固体であることから、この項は K_1 の式3から削除した。

$$K_1 = \frac{[\gamma\text{-CD}\cdot\text{GZK}_2][(\text{CoQ}_{10})^{0.4}]}{[\text{GZK}_2]} \quad \dots (3)$$

$$K_2^{0.4} = \frac{[\text{CoQ}_{10}\cdot(\text{GZK}_2)_n]^{0.4}}{[\text{CoQ}_{10}]^{0.4} [\text{GZK}_2]^{0.4n}} \quad \dots (4)$$

CoQ₁₀/γ-CD包接複合体の懸濁液にGZK₂を添加した際の、CoQ₁₀の溶解度をCoQ₁₀·(GZK₂)_n として、γ-CDの溶解度をγ-CD·GZK₂として、HPLCを用いて調べた。30°CのCoQ₁₀過飽和溶液にGZK₂を添加した際のCoQ₁₀およびγ-CDの溶解度変化から、CoQ₁₀·GZK₂ミセルの形成と水溶性GZK₂/γ-CD包接複合体の形成は攪拌時間に伴い増加し、一定の値で平衡状態に達した。CoQ₁₀とγ-CDの溶解度上昇は、CoQ₁₀とGZK₂のミセル形成、およびGZK₂とγ-CDとの包接複合体の形成として説明することができる。γ-CD中のCoQ₁₀の過飽和溶液にGZK₂を添加することによって置換反応が起こる。γ-CDに対するGZK₂の結合定数は非常に高く、GZK₂はγ-CDとの量論比が1:1の安定な水溶性包接複合体を形成することが知られている。また、GZK₂のMilli-Q水中の臨界ミセル濃度 (CMC) は、約1.3 mMであった。γ-CDに対するGZK₂のモル比が0.5以上の時、GZK₂濃度がCMC以上となるため、CoQ₁₀とGZK₂とミセルを形成しているものと考察される。

CoQ₁₀およびγ-CDの溶解度上昇の挙動を、Noyes-Whitneyの溶解速度式を用いた一次反応によって近似した。CoQ₁₀はGZK₂とミセルを形成し、γ-CDはGZK₂との水溶性の包接複合体を形成すると考えられる。CoQ₁₀とGZK₂とのミセルの形成およびGZK₂とγ-CDとの包接複合体形成の速度定数をγ-CDに対するGZK₂のモル比に対してプロットした。γ-CDに対するGZK₂のモル比が0.1~2においては良好な直線性が得られ、その後CoQ₁₀およびγ-CD共に飽和に達した。CoQ₁₀およびγ-CD両方の直線の傾きは類似しており、γ-CD空洞内のCoQ₁₀からGZK₂への置換反応が、自発的な逐次反応を介してCoQ₁₀とGZK₂とのミセル形成に至っているものと示唆された。

GZK₂/γ-CDのモル比に対するCoQ₁₀およびγ-CDの溶解度変化では、CoQ₁₀とγ-CDの溶解度はGZK₂/γ-CDのモル比が1.6の値まで直線的に増加し、それ以上では一定の溶解度であった。GZK₂/γ-CDのモル比が2以上の時、最大溶解度はCoQ₁₀が約2.5 mM、γ-CDが約9.8 mMに達した。これらの結果は、GZK₂が添加された際のCoQ₁₀/γ-CD包接複合体からのγ-CDの溶出による、GZK₂/γ-CD包接複合体の形成量が原因で、γ-CDの溶解度が制限され得ることを示唆している。飽和に達する前の直線の傾きは、式1と式2の全体の平衡定数 K を示し、平衡定数 K は、 K_1 と $K_2^{0.4}$ の積で与えられる。

$$K = \frac{[\gamma\text{-CD} \cdot \text{GZK}_2][\text{CoQ}_{10} \cdot (\text{GZK}_2)_n]^{0.4}}{[\text{GZK}_2]^{1+0.4n}} \quad \dots (5)$$

式5から、右辺の分子 (Y) は次のように導き出すことができる。

$$Y = K \cdot [\text{GZK}_2]^{1+0.4n} \quad \dots (6)$$

ここで、 Y は平衡定数 K とGZK₂濃度の $(1+0.4n)$ 乗の積として定義される。GZK₂の濃度に対する Y の値を、GZK₂/γ-CDのモル比が1.5以下の溶解度の数値を用いた解析によって、 $Y = 0.68[\text{GZK}_2]^{1.4}$ を表す直線により実験値を相関できた。このプロットより、反応式全体の平衡定数は $K = 0.68 (-)$ となり、指数 n は1と算出された。指数である $n=1$ は、ミセル構造にてCoQ₁₀に対するGZK₂のモル比が1:1であることを示している。

ミセル形成の反応に使われなかった沈殿物の粉末に関して、γ-CD中のCoQ₁₀の含有率をDSCによって測定した。γ-CDから解離することで生じるγ-CD未包接のCoQ₁₀原末に由来する吸熱エネルギーから求めたCoQ₁₀のγ-CD包接率を、γ-CDに対するGZK₂のモル比に対してプロットした。γ-CDに包接されたCoQ₁₀の屈曲点は、γ-CDに対するGZK₂のモル比が約1.6であった。CoQ₁₀の液相と固相の両方において、γ-CDに対するGZK₂のモル比が約1.6で、屈曲点が観察された。このモル比は上清中のCoQ₁₀最大溶解度と、ミセル形成が可能なCoQ₁₀濃度の境界を示すとされる。CoQ₁₀とGZK₂とのミセル形成は、γ-CD空洞内のGZK₂とCoQ₁₀の置換反応と連続して起こる可能性があり、これらの結果は本研究のミセル形成機構が妥当であることを示唆している。

ミセルの大きさを視覚的に観察するため、AFMを使用した。AFM画像においては、乾燥した溶液の小さな粒子が観察され、大体が30 nm未満の径であった。CoQ₁₀とGZK₂とのミセル溶液にはGZK₂/γ-CD包接複合体とGZK₂ブランクミセルも含まれる。CoQ₁₀ミセルの平均径は画像解析によって算出され、21.7 nmであった。水溶液中には様々な内容物が含まれ、それぞれの推定濃度はCoQ₁₀とGZK₂とのミセルが0.56 mM、水溶性のGZK₂/γ-CD包接複合体が4.12 mM、GZK₂ブランクミセルが1.39 mMと計算された。GZK₂のミセルはpH7.4の条件において、20分子が会合して球状ミセルを形成し、その径は約4.5 nmと報告されている。AFM画像において、多くの粒子は水溶性のGZK₂/γ-CD包接複合体を示しているかも知れない。したがって、CoQ₁₀とGZK₂とのミセルは、GZK₂/γ-CD包接複合体と同等、或いはそれよりも小さいと推察される。

CoQ₁₀・GZK₂ミセルの平均径は、レーザーダイオードを搭載した光ファイバー粒子分析装置 (光子計数法; FPAR-1000) または動的光散乱式の粒子径分析装置 (DLS; Zetasizer Nano ZS) により測定した。光子計数法による測定法では約52~64 nm、DLSによる測定法では約35~39 nmの平均径を示した。この混合系においては、CoQ₁₀とGZK₂とのミセルやGZK₂/γ-CD包接複合体のような大きな粒子の方が、

GZK₂ブランクミセルのような小さな粒子よりも高感度で検出されるため、GZK₂ブランクミセルの平均径は無視することができる。CoQ₁₀・GZK₂ミセルのゼータ電位は、Zetasizer Nano ZSを用い、レーザードップラー法にて測定した。CoQ₁₀・GZK₂ミセルのゼータ電位は、おおよそ-60~-50 mVの高い負の電荷を示した。ゼータ電位の絶対値が増加すると粒子同士の反発が強くなり、粒子の安定性が向上する。γ-CDに対するGZK₂のモル比が高いほど、ゼータ電位は高くなる傾向を示した。アニオン性界面活性剤であるGZK₂の濃度が、ゼータ電位に影響しているものと示唆された。

第2章の小括として、CoQ₁₀/γ-CDの包接複合体へのGZK₂の添加によって、CoQ₁₀がGZK₂とミセルを形成し、CoQ₁₀の水への溶解性が大きく上昇した。これは、γ-CDと結合定数の高いGZK₂を添加することによって、γ-CD空洞内のCoQ₁₀とGZK₂の置換反応が生じ、次いで解離したCoQ₁₀がGZK₂のミセルに包括され溶解したと示唆された。式6より、CoQ₁₀とGZK₂とのミセル形成の反応式が導き出され、反応式全体の平衡定数は $K=0.68$ (-) となり、CoQ₁₀とGZK₂のミセル形成の化学量論係数 n は1と算出された。

第3章 CoQ₁₀ミセルの皮膚吸収性に関する評価

第3章では、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体を用いて調製したCoQ₁₀とGZK₂のミセルの機能性を評価するため、ヒト3次元培養表皮モデルを用いて*in vitro* による皮膚吸収性試験を実施した。CoQ₁₀は体内で抗酸化物質として働くことから、アンチエイジングを目的としてCoQ₁₀を配合した化粧品は多く存在する。GZK₂は皮膚コンディショニング剤として化粧品に使用されており、抗炎症作用や抗アレルギー作用を有することから、風邪薬等の医薬品にも幅広く使用されている。CoQ₁₀、GZK₂共に化粧品素材をして、有効な成分といえる。CoQ₁₀は凝集性が高く、分子量も863と比較的大きいため、CoQ₁₀のミセルを形成し、吸収性を向上させることは重要と考えられる。

生体内のCoQ₁₀量は加齢に伴い減少することが指摘されているが、皮膚においても例外ではない。生体組織中のCoQ₁₀量が減少するように、皮膚のCoQ₁₀含量も年齢と共に直線的に減少することが知られており、外部からのCoQ₁₀の補給は有効とされる。しかしながら、日本においては医薬部外品を除く、化粧品としてのCoQ₁₀の配合上限は0.03 %と化粧品基準に定められている。よって、少ない量のCoQ₁₀を効率的に皮膚に取り込ませる工夫が必要とされている。

ヒトの皮膚構造は大きく分けて、上皮性の表皮とその下に位置する結合組織の真皮から構成されており、さらに皮下組織や脂肪組織に繋がっている。皮膚の上皮部分では細胞分裂から角化し、剥がれ落ちるまで約4週間を要するとされる。第3章では、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とGZK₂の併用によって得られたCoQ₁₀ミセルの性能評価を、市販のヒト3次元培養表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL 12) を用いてCoQ₁₀の皮膚吸収性を評価した。これはヒト正常表皮細胞を重層培養したヒト3次元培養表皮モデルであり、基底層、有棘層、顆粒層、角質層を有し、形態的にヒト皮膚に類似していることが特徴として挙げられる。ヒト細胞を用いているため、動物実験と比較して種差がないほか、ウェル間、ロット間のバラツキが少なく、再現性の高い試験結果を得ることが特長として挙げる手法といえる。

3次元培養表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL 12) を用い、表皮組織1ウェル (表面積1.1 cm²) あたりのCoQ₁₀取り込み量を評価した。いずれも試料を各200 μL添加し、37°C、5 % CO₂の条件下にて6時間インキュベートした。CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とGZK₂を組み合わせたCoQ₁₀ミセルにおいて、1ウェルあたり約17 μgのCoQ₁₀が皮膚組織へ取り込まれることが確認された。CoQ₁₀/γ-CD包接複合体単体の懸濁液と比べて格段に高く、ポジティブコントロールの0.1 w/v% CoQ₁₀/エタノール溶液と同程度の高い吸収が得られた。CoQ₁₀ミセルの平均粒子径は、おおよそ30~60 nmのナノサイズであったことから、取り込み効率が向上したものと推察される。その他のCoQ₁₀を含有する試料においては、CoQ₁₀の取り込み量は微量であった。尚、ブランクのPBSで得られたCoQ₁₀量は約0.2 μg/ウェルであり、もともと細胞中に存在する内因性のCoQ₁₀と考えられる。

CoQ₁₀/γ-CD包接複合体に対するGZK₂の配合量を変えた場合の皮膚組織への取り込み量を測定した。CoQ₁₀ミセルの溶解度を0.03, 0.1, 0.2 w/v%になるように溶液を調製した。各試料の皮膚組織へのCoQ₁₀の取り込み量は、それぞれ3, 17, 10 μg/ウェルであった。GZK₂の配合量を増やすことでCoQ₁₀の溶解度を高めた0.2 w/v%濃度の試料では、0.1 w/v%濃度の試料よりもCoQ₁₀の取り込み量が減少した。原因としてはミセルの粒子径や親水性-新油性バランスの違いや、試料中に大量に溶け込んでいるGZK₂がCoQ₁₀の皮膚への移行を阻害した可能性も考えられ、皮膚組織への取り込みにおいてCoQ₁₀或いはGZK₂の至適濃度があると推察される。

他のCoQ₁₀製剤との比較試験を同様に実施した。様々な水溶化製剤、リポソーム製品を試したが、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とGZK₂から調製されたCoQ₁₀ミセルのような高い取り込みは確認できなかった。CoQ₁₀のγ-CD包接によって各種細胞で取り込み量の増加が認められたのは、CoQ₁₀ミセルの溶解度が高いためと考えられる。本研究により、CoQ₁₀ミセルの化粧品としての有用性を確認することができた。

第3章の小括として、表皮細胞中に存在する内因性のCoQ₁₀量は約0.2 μg/ウェルであった。CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とGZK₂の組み合わせによって得られたCoQ₁₀ミセル (CoQ₁₀濃度: 0.1 w/v%) において、CoQ₁₀の皮膚吸収性を評価したところ、約17 μg/ウェルのCoQ₁₀の皮膚組織への取り込みが確認された。これは他社のCoQ₁₀製剤に比べて、非常に高い値であった。CoQ₁₀ミセルの平均粒子径はおおよそ30~60 nmと微小であるため、取り込み効率が向上したものと推察される。

第4章 CoQ₁₀ ミセルの還元反応

CoQ₁₀とγ-CDの包接複合体粉末を経口摂取した場合、腸管にて胆汁酸とCoQ₁₀が先に示したGZK₂同様に置換反応し、胆汁酸とCoQ₁₀のミセルが形成すると推察される。第4章では、CoQ₁₀とγ-CDの包接複合体粉末を経口摂取した場合の可溶性CoQ₁₀ (CoQ₁₀と胆汁酸によるミセル濃度) の生成速度を食前および食後の胆汁酸濃度の異なる人工腸液を用いて検討した。

人工腸液は各種薬剤の吸収性を見る実験にて、薬剤の有効成分の吸収性を評価・予測する目的で使用されている。これは実際の小腸内部の成分を基に調製されており、胆汁酸塩やレシチンを含む処方採用されている。代表的な胆汁酸塩であるタウロコール酸ナトリウムは先に述べたGZK₂と同様に界面活性性を有し、臨界ミセル濃度以上ではミセル構造を形成し、脂溶性化合物をそのミセル内に包括することで溶解させる性質がある。人工腸液の処方としては試薬の種類や濃度によって様々であるが、主には食前人工腸液 (FaSSIF) と食後人工腸液 (FeSSIF) の2種類の組成に大別される。食前と食後の腸液において大きく異なるのは胆汁酸の濃度である。一般的には、食前条件下のタウロコール酸ナトリウム濃度が3 mMに対して、食後条件下では15 mMと高濃度である。タウロコール酸ナトリウムはγ-CDとの結合定数が高いことも特徴とされ、GZK₂と同様のミセル形成のメカニズムによって、酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体からのミセル形成が可能とされる。即ち、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体にγ-CDとの相互作用が強いタウロコール酸ナトリウムを添加することで、疎水性のγ-CD空洞内においてCoQ₁₀とタウロコール酸ナトリウムの置換反応が起きると共に、CoQ₁₀がタウロコール酸ナトリウムのミセルに取り込まれ、溶解性の向上が期待される。

また、CoQ₁₀は生体内において酸化型CoQ₁₀と還元型CoQ₁₀として存在し、何れのCoQ₁₀も健康維持のために重要な働きを担っている。生体内の腸管膜からの吸収性に関しては、酸化型CoQ₁₀よりも還元型CoQ₁₀の方が優れているとされる。しかしながら、還元型CoQ₁₀は酸化型CoQ₁₀に比べて価格的に高価であり、酸素に対する安定性も低く、取り扱いに注意を要する物質である。したがって、安定な酸化型CoQ₁₀の状態でも摂取し、生体内での吸収過程で還元型CoQ₁₀に変換させることができれば、吸収効率の向上が期待できる。酸化型CoQ₁₀から還元型CoQ₁₀への変換には、還元剤が必要となる。食品等に一般的に用いられている還元剤としてVCが挙げられる。VCは過酸化水素、ヒドロキシラジカル等の

活性酸素を消去し、強い還元能を有することで知られている。また、商業的にも安価であるため、食品や化粧品の酸化防止剤等としても幅広く使用されている。

これまでに、酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とVCを混合し、60°C、75 %RHの高温高湿条件下に粉末状態で静置することにより、効率良く還元型CoQ₁₀に変換することを報告している。しかしながら、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体は水に不溶性であるために、水溶液中での還元反応を評価することは困難であった。第4章では、酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体を含有した健康食品を摂取した際を想定し、界面活性剤の一種である胆汁酸、すなわちタウロコール酸ナトリウムを含有する人工腸液を用いて、酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体の溶解挙動を評価した。また、同時に還元剤であるVCを添加することによって、ミセル化した酸化型CoQ₁₀から還元型CoQ₁₀への変換を検討した。

α-CD、β-CD、γ-CDの酸化型CoQ₁₀包接複合体を用意し、人工腸液中での酸化型CoQ₁₀の溶出挙動を評価した。対照として、CDを配合していない酸化型CoQ₁₀原末を使用した。FaSSIFおよびFeSSIFへの酸化型CoQ₁₀溶解度の時間変化を示した。酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体に関しては、FaSSIFへの酸化型CoQ₁₀の最大濃度は約0.06 mMで、FeSSIFへの酸化型CoQ₁₀の最大濃度は0.5 mM以上に達し、顕著な溶解度上昇が認められた。FaSSIFとFeSSIFとでは、酸化型CoQ₁₀の溶解度に約10倍の差が生じたが、人工腸液中に含まれるタウロコール酸ナトリウムの濃度が、FaSSIFでは3 mM、FeSSIFでは15 mMと異なることが大きな要因として挙げられる。酸化型CoQ₁₀は経口摂取する際、胆汁酸つまりは食事の影響を非常に受けやすい化合物であるといえる。

酸化型CoQ₁₀/β-CD包接複合体に関しては、FeSSIFへの酸化型CoQ₁₀の溶解度が約0.2 mMまで上昇し、酸化型CoQ₁₀/α-CD包接複合体や酸化型CoQ₁₀原末では、FeSSIF中においても酸化型CoQ₁₀の溶出はほとんど認められなかった。このことから、GZK₂の場合と同様のミセル形成のメカニズムが推察される。すなわち、γ-CDに対する結合定数の高いタウロコール酸ナトリウムが酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体に加わることによって、γ-CD空洞内において酸化型CoQ₁₀とタウロコール酸ナトリウムの置換反応が生じる。次いで、タウロコール酸ナトリウムの疎水性部位をγ-CDが包接することによって、水溶性の包接複合体が形成される。それと同時に、解離した酸化型CoQ₁₀はタウロコール酸ナトリウムのミセルに包括され、酸化型CoQ₁₀の溶解性が向上したと推察される。

また、FaSSIFおよびFeSSIF中のCoQ₁₀溶解量に対するVCの依存性をアブラミ式 (7) で相関した。

$$C_T = C_{\max} (1 - \exp(-k_1 t)^n) \quad \dots (7)$$

ここで、C_Tは還元型CoQ₁₀(C_R)と酸化型CoQ₁₀(C_O)を足した総CoQ₁₀の溶解量(C_T)を示す。C_{max}は各VC濃度に対する総CoQ₁₀の飽和溶解量を示す。k₁は総CoQ₁₀のみかけの溶解速度定数、nはその反応機構定数を示す。Microsoft Excelのソルバー機能を用いて、式7の理論値と実験値との差がなるべく0に収束するよう最小二乗法にて、nおよびk₁を算出した。FaSSIFの場合、最大のCoQ₁₀溶解量C_{max}はVCに依存して直線的に減少した。その減少は、ミセル形成にVCが関与していることを示唆していると考えられる。タウロコール酸ナトリウムとCoQ₁₀との置換反応速度および反応機構定数はVC濃度に依存せず一定であった。溶解速度定数k₁ = 3.2 × 10⁻⁴ (s⁻¹), n = 0.84 (-) となり、置換反応によるCoQ₁₀の溶解量はVCが大きいほど小さくなる傾向を示した。FeSSIFへの総CoQ₁₀溶解量の変化はVC濃度に依存せず、CoQ₁₀溶解量はほぼ一致した。最大のCoQ₁₀溶解量C_{max}は約463 μMとほぼ一定で、速度定数k₁ = 3.2 × 10⁻⁴ (s⁻¹), n = 0.84 (-) はFaSSIFと同様に相関できた。FaSSIFへのCoQ₁₀の溶解最大量がVCに阻害されているのに対して、FeSSIFの場合は最大溶解量が若干異なるが相関値は一定であった。

ある時間での総CoQ₁₀溶解量に対する還元型CoQ₁₀溶解量の比(R)は、R = C_R/C_Tで示すことができる。また、この還元型CoQ₁₀溶解量の比は、アブラミ式(8)で次のように相関した。

$$R = 1 - \exp(-(k_2 C_v t)^n) \quad \dots (8)$$

ここで、k₂はみかけの還元速度定数、C_vはVC濃度、nは反応機構定数を示す。Microsoft Excelのソ

ルバー機能を用いて、式8の理論値と実際の実験値との差がなるべく0に収束するよう最小二乗法にて、 n および k_2 を算出した。FaSSIFでの還元型CoQ₁₀の割合は、VC添加試料ではVC濃度の増加に伴い経時的に上昇し、最終的には4~7割の変換率であった。また、FeSSIFでの還元型CoQ₁₀の割合も、VCを添加した試料では経時的に増加した。特にVC濃度が高い試料では、試験開始2時間の時点で約8割が還元型CoQ₁₀に変換された。VCを含むFaSSIFおよびFeSSIFにCoQ₁₀/ γ -CD包接複合体粉末を添加した場合、人工腸液中のタウロコール酸ナトリウムと γ -CD中のCoQ₁₀が置換し、人工腸液中のタウロコール酸ナトリウムとCoQ₁₀のミセルが形成されると考えられる。このミセル中のCoQ₁₀が酸化体であるため、VCで還元される。ここで、機構定数は固定で $n=0.54$ (-)とした。みかけの還元速度定数はFaSSIFの場合に $k_2=1.5 \times 10^{-4}$ (s⁻¹M⁻¹)、FeSSIFの場合に $k_2=1.3 \times 10^{-3}$ (s⁻¹M⁻¹)となり、10倍近くの差が認められた。この還元型CoQ₁₀生成速度定数のFaSSIFとFeSSIFとの相違は、ミセル形成に関わるタウロコール酸ナトリウムとレシチンの濃度の相違によるものと推察される。尚、この試験系ではVC濃度は分子量的にCoQ₁₀よりも大過剰に存在するため、CoQ₁₀の酸化還元反応を考えるにあたり、VCによる酸化型CoQ₁₀の還元反応のみを考えれば良く、溶存酸素や酸化されたVCによる還元型CoQ₁₀の酸化反応は無視できるものと考えられる。

第4章の小括として、酸化型CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体は水への溶解性が低いが、界面活性剤として作用する胆汁酸の一種であるタウロコール酸ナトリウムを併用することによって、酸化型CoQ₁₀の水への溶解性が向上した。これは、GZK₂の場合と同様のメカニズムで、 γ -CDに対する結合定数の高いタウロコール酸ナトリウムが酸化型CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体に加わることによって、 γ -CD空洞内において酸化型CoQ₁₀とタウロコール酸ナトリウムの置換反応が生じ、解離した酸化型CoQ₁₀はタウロコール酸ナトリウムのミセルに包括され、溶解性が向上したと推察された。CoQ₁₀ミセルの形成および還元型CoQ₁₀の割合を、アブラミ式を用いて良好に相関できた。更に、水溶性の還元剤であるVCを添加することによって、ミセルとして溶解している酸化型CoQ₁₀が還元型CoQ₁₀に変換されることが確認された。したがって、CoQ₁₀をサプリメント等の健康食品として摂取する際には、酸化型CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体とVCを併用することによって、腸管内の吸収過程において還元型CoQ₁₀へ変換が促進され、吸収効率も高まる可能性が示唆された。

第5章 結言

CoQ₁₀を γ -CDで包み込んだCoQ₁₀/ γ -CD包接複合体には、CoQ₁₀の安定性や経口吸収性の改善作用が既に見出されている。しかしながら、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体は、水への分散性は高いものの、水に不溶な微小の凝集体を形成しているため、水への溶解度は高いとは言い難い。そこで界面活性剤の併用によるCoQ₁₀/ γ -CD包接複合体の水への溶解性改善を試みたところ、GZK₂の添加によってCoQ₁₀の水への溶解度が劇的に上昇することを見出した。包接化によって高分散したCoQ₁₀/ γ -CD包接複合体に γ -CDとの相互作用が強いGZK₂を添加したことで、 γ -CD空洞内においてGZK₂とCoQ₁₀の置換反応が起き、 γ -CDから解離したCoQ₁₀は周囲に存在するGZK₂ミセルに取り込まれて溶解した可能性が示唆された。

第2章では、CoQ₁₀/ γ -CD包接複合体を中間物質として用いたGZK₂によるCoQ₁₀のミセル形成の機構を明らかとするため、GZK₂を添加した際のCoQ₁₀/ γ -CD包接複合体からのCoQ₁₀および γ -CDの溶解挙動や水溶液中でのCoQ₁₀ミセルの物理化学的特性をHPLCによる定量にて評価した。また、CoQ₁₀ミセルの平均粒子径をDLSにて測定し、CoQ₁₀ミセルの構造をAFMにて直接的に観察した。CoQ₁₀/ γ -CDの包接複合体へのGZK₂の添加によって、CoQ₁₀がGZK₂とミセルを形成し、CoQ₁₀の水への溶解性が大きく上昇した。これは、 γ -CDに対する結合定数の高いGZK₂が加わることによって、 γ -CD空洞内においてCoQ₁₀とGZK₂の置換反応が起き、次いで γ -CDから解離したCoQ₁₀がGZK₂のミセルに包括され溶解したと示唆された。CoQ₁₀とGZK₂とのミセル形成の反応式から、反応式全体の平衡定数は $K=0.68$ (-)となり、指数 n は1と算出された。このことから、ミセル構造のCoQ₁₀に対するGZK₂のモル比は1:1と推

察された。また、CoQ₁₀ミセルの平均径は、測定原理によって違いがあるものの、おおよそ30~60 nmの値が得られた。

第3章では、得られたCoQ₁₀ミセルの機能性評価として、CoQ₁₀とGZK₂共に化粧品素材をして使用されている有効成分であることから、*in vitro* による皮膚吸収性試験を実施した。試験にはヒト3次元培養表皮モデルを用いて、表皮組織に取り込まれたCoQ₁₀量を評価した。CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とGZK₂の組み合わせによって得られたCoQ₁₀ミセル (CoQ₁₀濃度: 0.1 w/v%) において、CoQ₁₀の皮膚吸収性を評価したところ、1ウェルあたり約17 μgのCoQ₁₀の皮膚組織への取り込みが確認された。内因性のCoQ₁₀量は僅か0.2 μg/ウェルであり、他社のCoQ₁₀製剤に比べても非常に高い値であった。CoQ₁₀ミセルの平均粒子径は30~60 nmと微小であるため、取り込み効率が向上したものと推察される。CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とGZK₂を用いて作製した可溶化したCoQ₁₀の化粧品としての有用性を確認することができた。

第4章では、GZK₂と同様に胆汁酸の一種であるタウロコール酸ナトリウムも、γ-CDとの相互作用が強く、界面活性を有する化合物であることから、医薬品製剤等の吸収性評価に利用されているタウロコール酸ナトリウムを含有する模擬人工腸液を用い、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体からのCoQ₁₀の溶出挙動を評価した。更に、CoQ₁₀は酸化型と還元型の2つの構造体が知られている。エネルギー産生においてはどちらも必要な補酵素であるが、抗酸化活性を発揮するのは還元型CoQ₁₀であり、また還元型の方が腸管からの吸収性が高いとの報告も出ている。そこで、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体と還元剤としてVCを同時に経口摂取した場合を想定し、人工腸液中でのVCによる酸化型CoQ₁₀から還元型CoQ₁₀への変換を検討した。人工腸液へのCoQ₁₀の溶解性はCoQ₁₀/γ-CD包接複合体で経時的に上昇し、FeSSIFの方がFaSSIFよりも顕著であった。GZK₂の場合と同様のメカニズムで、γ-CDに対する結合定数の高いタウロコール酸ナトリウムが酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体に加わることによって、γ-CD空洞内において酸化型CoQ₁₀とタウロコール酸ナトリウムの置換反応が生じ、解離した酸化型CoQ₁₀はタウロコール酸ナトリウムのミセルに包括され、溶解性が向上したと推察された。更に、水溶性の還元剤であるVCを添加することによって、ミセルとして溶解している酸化型CoQ₁₀が還元型CoQ₁₀に変換されることが確認された。したがって、CoQ₁₀をサプリメント等の健康食品として摂取する際には、酸化型CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とVCを併用することによって、腸管内の吸収過程において還元型CoQ₁₀へ変換が促進され、吸収効率も高まる可能性を示すことができた。

本研究では、CoQ₁₀/γ-CD包接複合体とGZK₂を用いたCoQ₁₀のミセル形成機構を物理化学的に検討し、γ-CD空洞内のCoQ₁₀とGZK₂の置換反応、γ-CDから解離したCoQ₁₀とGZK₂のミセル形成反応から成るモデルを提案した。以上の研究結果から、CoQ₁₀はもとよりCoQ₁₀/γ-CD包接複合体の利用価値が著しく向上するものと期待される。